



SUOMI-FINLAND
(FI)

(11) (21) Patenttihakemus - Patentansökan 971872
(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6
A 23J 1/20, 3/08, 3/34, A 23C 11/00
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 30.04.1997
(24) Alkupäivä - Löpdag 30.04.1997
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 31.10.1998

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. Valio Oy, Meijeritie 4, 00370 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Vaarala, Outi, Sysimiehentie 51 A, 00670 Helsinki, (FI)
2. Tossavainen, Olli, Koroistentie 7 A 10, 00280 Helsinki, (FI)
3. Syväoja, Beva-Liisa, Tonttutyöntökuja 3 D 21, 02200 Espoo, (FI)
4. Kerojoki, Outi, Isonniitynk. 7 F 25, 00520 Helsinki, (FI)
5. Harju, Matti Erkki, Harjutie 6 G 2, 03100 Nummela, (FI)
6. Salminen, Kari, Mannerheimintie 60 A 8, 00260 Helsinki, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Isc Robertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus
Proteinsammansättning samt dess framställning och användning samt den innehållande produkter och deras framställning

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista että, se on valmistettu poistamalla naudan insuliini lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiniliuoksesta. Lisäksi keksinnön kohteena kyseisen proteiinikoostumuksen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet, kuten oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

Uppfinningen avser en väsentligen insulinfri proteinsammansättning kännetecknad av, att den framställts genom att avlägsna nötinulinet från ett korjölkbaserat fettfritt proteinhaltigt material, såsom vassla, fettfri mjölk eller kaseinlösning. Vidare avser uppfinningen framställning och användning av nämnda proteinsammansättning samt denna innehållande produkter, såsom väsentligen insulinfria modersmjölkersättningar och andra specialfödoämnen och framställning av dem.

Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus

5 Keksinnön kohteena ovat proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus. Erityisesti keksinnön kohteena ovat oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet, kuten oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut
10 erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

 Nuoruusiän diabetes eli insuliininpuutoksesta johtuva diabetes mellitus (IDDM) on sairaus, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia tuottavat beeta-solut ovat tuhoutuneet, mutta saarekkeiden muut solut säilyvät
15 vahingoittumattomina. Kyseinen sairaus puhkeaa yleensä viimeistään lapsuusiässä.

 Lukuisista lääketieteellisistä tutkimuksista huolimatta ei vielä tarkasti tiedetä, mitkä tekijät aiheuttavat nuoruusiän diabeteksen puhkeamisen. Tällä hetkellä kuitenkin uskotaan, että lasten riskiin sairastua nuoruusiän diabetekseen vaikuttavat sekä perintötekijät että ympäristötekijät, kuten ravinto.

 Useissa epidemiologisissa tutkimuksissa on mm. todettu, että altistuminen lehmänmaidon proteiineille imeväisaikana lisää riskiä sairastua nuoruusiän diabetekseen (Gerstein, Diabetes Care 17 (1994) 13 - 19). Epidemiologisten havaintojen perusteella on esitetty useita hypoteeseja mekanismeista, miten lehmän maidon proteiinit voisivat toimia diabetogeenisinä tekijöinä. On todettu, että
25 immuunivaste naudan seerumialbumiinia (Karjalainen et al., N. Engl. J. Med. 327 (1992) 302-307), beeta-laktoglobuliinia (Vaarala et al., Diabetes 45 (1996) 178-182) tai beeta-kaseiinia (Cavallo et al., Lancet 348 (1996) 926-28) kohtaan voisi johtaa beeta-solureaktiivisuuteen, mutta
30 tähän mennessä naudan insuliinin ei ole edes epäilty olevan diabetogeeninen riskitekijä.

Lehmänmaidon tiedetään normaalisti sisältävän pieniä määriä naudän insuliinia. Kirjallisuudessa ilmoitettu maidon insuliinipitoisuus vaihtelee määritysmenetelmästä riippuen, mutta esimerkiksi ELISA-menetelmällä on todettu
 5 noin 50 ng/ml pitoisuuksia. Maidon insuliinipitoisuus on suurimmillaan (noin 330 ng/ml) heti poikimisen jälkeen, minkä jälkeen pitoisuus alenee saavuttaen vakiotason (noin 46 ng/ml) noin 7 päivän kuluttua poikimisesta (Aranda et al., J. Dairy Sci. 74 (12) (1991) 4320 - 4325).

10 Hakiija on tutkimuksissaan todennut, että tavanomaisen lehmänmaitopohjaisen äidinmaidonkorvikkeen antaminen imeväisikäisille saa aikaan vasta-aineiden, kuten insuliinivasta-aineiden, tuotannon naudän insuliinia kohtaan. Tavanomaista lehmänmaitopohjaista äidinmaidonkorviketta
 15 (Enfamil[®]) lisäruokintana saaneiden 6 kuukauden ikäisten lasten ja toisaalta yksinomaan rintamaitoa saaneiden samanikäisten lasten IgG-luokan vasta-ainepitoisuudet naudän insuliinia kohtaan on esitetty kuvassa 1. Nämä vasta-aineet ristireagoivat humaani-insuliinin kanssa.

20 Koska insuliiniautovasta-aineiden (IAA):n esiintyminen edeltää ja ennustaa IDDM:n puhkeamista, immunisointuminen naudän insuliinille lehmänmaitopohjaisista tuotteista voi olla haitallista ja lisätä riskiä sairastua IDDM:ään. Tästä syystä on tarve saada markkinoille lehmänmaitotuotteita ja lehmänmaitopohjaisia tuotteita, jotka eivät
 25 sisällä immunoreaktiivista naudän insuliinia.

Insuliinin puhdistuksessa tuotanto- ja uuttoliuokista on perinteisesti käytetty nestekromatografiaa ja käänteisfaasikolonnia (Kroeff et al., J. Chromatogr. 461
 30 (1989) 45 - 61; Poll et al., J. Chromatogr. 539 (1991) 37 - 45; Cox, J. Chromatogr. 599 (1992) 195 - 203; Welinder, J. Chromatogr. 542 (1991) 83 - 99), geelisuodatus- tai anioninvaihtokolonnia (WO 90/00176 ja WO 90/00177) tai heikkoa kationinvaihtokolonnia (DE 3511270 A1 ja GB
 35 2173503 A). Käänteisfaasi- tai geelisuodatuskromatografia

eivät sellaisenaan sovi maidon käsittelyyn, koska käsittelyn maidon tulisi olla elintarvikekelpoista ja kohtuullisen hintaista.

5 Missään hakijan tuntemassa tunnetun tekniikan mukaisessa julkaisussa ei kuitenkaan ole esitetty eikä edes ehdotettu lehmänmaidossa läsnäolevan naudan insuliinin eristämistä tai poistamista.

10 Hakija on nyt keksinyt, miten lehmänmaidosta saadaan kohtuullisin kustannuksin elintarvikekelpoinen proteiinikoostumus, joka on oleellisesti naudaninsuliiniton ja joka sellaisenaan sopii erityisesti äidinmaidonkorvikkeen, mutta myös muiden erityisravintovalmisteiden proteiiniosaksi.

15 Keksinnön kohteena on siten oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista, että se on valmistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta.

20 Kun maidosta poistetaan rasva ja kaseiini, saadaan hera, joka sisältää heraproteiinit. Maidon kokonaisproteiinista noin 20 prosenttia on heraproteiineja ja loput kaseiinia. Juustonvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa kutsutaan juustoheraksi ja kaseiininvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa puolestaan kutsutaan kaseiiniheraksi.

25 Keksinnössä käytettävä hera voi olla mikä tahansa lehmänmaidosta peräisin oleva hera, kuten esimerkiksi juustohera, juoksetekaseiinihera, happokaseiinihera tai hapan juustohera. Edullisesti hera on juustohera.

30 Heran lisäksi keksinnössä voidaan käyttää lehmänmaidosta peräisin olevana rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina rasvatonta maitoa tai rasvattomasta maitojauheesta tehtyä vesiliuosta tai maidon kaseiinista tehtyä vesiliuosta, ts. kaseiiniliuosta.

35 Keksinnön mukainen oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus voidaan sopivasti valmistaa keksinnön mukai-

sella menetelmällä, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että

5 a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpoistokäsittelyyn,

b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen materiaali

10 konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja, saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja kuivataan proteiinijauheeksi,

c) mahdollisesti

15 1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoidaan entsymaattisesti proteaaseilla ja

3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ultrasuodatetaan, ja

20 d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi.

25 Vaiheessa a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpoistokäsittelyyn, jolloin oleellisesti kaikki tai ainakin merkittävä osa kyseisessä materiaalissa olevasta naudan insuliinista saadaan poistettua. Insuliininpoistossa kyseistä lehmänmaidosta peräisin olevaa nestemäistä materiaalia voidaan käsitellä vahvalla kationinvaihtohartsilla tai se voidaan kirkastaa esimerkiksi mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla. Hera voidaan tässä vaiheessa kirkastaa myös ultrasuodattamalla.

30

Parhaat insuliininpoistotulokset saadaan kuitenkin silloin kun puhdistettava materiaali ensin kirkastetaan edellä mainitulla tavalla ja sen jälkeen sitä käsitellään vahvalla kationinvaihtohartsilla.

5 Hera, kuten juusto- tai kaseiinihera on edullisinta puhdistaa naudan insuliinista vahvalla kationinvaihtohartsilla. Sopivia kationinvaihtohartseja ovat esimerkiksi Amberlite C-20 (Rohm & Haas, Ranska) ja Spherosil S. (Rhone-Poulenc, Ranska) Puhdistettava hera, jonka pH on las-
10 kettu arvoon 5,2 - 5,6 elintarvikelaatuisella hapolla, esimerkiksi HCl:lla, tai ioninvaihdolla, johdetaan 3 - 65 °C:ssa sopivasti huoneenlämpötilassa Na⁺- tai K⁺-muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihtohartsilla täytetyn pylvään läpi. Panosprosessissa syöttönopeus ja -tilavuus
15 voivat vaihdella, mutta sopivasti syöttönopeus on 1 - 10 pylvääntilavuutta (BV) / h ja syöttötilavuus on 5 - 60 BV, edullisesti 20 BV. pH-alueella 5,2 - 5,6 heran proteiinit ovat yleensä negatiivisesti varautuneita, mutta insuliini on positiivisesti varautunut, sillä sen isoelektrinen piste on 5,6 (Erkama, Biokemia, s. 185). Tällöin ainakin
20 oleellinen osa herassa olevasta naudan insuliinista sitoutuu kationinvaihtohartsiin negatiivisesti varautuneiden heraproteiinien mennessä pylvään läpi.

Edullisesti hera puhdistetaan naudan insuliinista
25 vahvalla kationinvaihtohartsilla pH:ssa 5,4.

Vahvalla kationinvaihtohartsilla puhdistetussa herassa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray-massaspektrometrillä.

Myös rasvattoman lehmänmaidon ja maidon kaseiinista
30 tehdyin vesiliuoksen, ts. kaseiiniliuoksen naudaninsuliinipitoisuutta voidaan alentaa merkittävästi vastaavalla käsittelyllä vahvalla kationinvaihtohartsilla. Tällöin kaseiiniliuoksen insuliinipitoisuus alenee ainakin noin 65 % ja rasvattoman maidon insuliinipitoisuus puolestaan alenee
35 ainakin noin 40 %.

Insuliini analysoitiin näytteistä electro spray-massaspektrometrillä (VG Quattro II, VG BioTech, Altrincham, Englanti) käyttäen esikäsittelynä fraktiointia nestekromatografien (Hewlett Packard HPLC 1090, Hewlett Packard Co. Saksa) C18-käänteisfaasikolonnilla (eluentit: A: 0,05 % trifluorietikkahappo (TFA) vedessä, B: asetonitriili (Acn) + 0,05 % TFA, gradientti: 15 % -> 40 % 20 min:ssa, 40 % -> 100 % 10 min:ssa). Insuliinia sisältävä fraktio pakkaskuivattiin, liuotettiin uudelleen konsentroiduksi liuokseksi ja johdettiin massaspektrometriin.

Heraa voidaan puhdistaa naudan insuliinista kirkastamalla hera esimerkiksi mikrosuodattamalla, ultrasuodattamalla tai sentrifugoimalla, jolloin herasta saadaan pois jäännöskaseiini ja muut suurimolekyylliset proteiinit, joihin insuliini hydrofobisena proteiinina on sitoutunut.

Mikrosuodatuksessa puhdistettava hera johdetaan sopivasti 10 - 60 °C:ssa mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

Ultrasuodatuksessa puhdistettava hera puolestaan käsitellään ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat kalvoja, joiden cut-off -arvo on 50 000 - 200 000 Daltonia.

Sentrifugoinnissa heraa käsitellään edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

Kirkastuskäsittely alentaa heran naudaninsuliinipitoisuutta 6 - 10 %.

Kirkastuskäsittely ja kationinvaihtohartsikäsittely alentavat molemmat käsiteltävän, lehmänmaidosta peräisin olevan materiaalin naudan insuliinipitoisuutta, mutta parhaat tulokset saadaan kun kyseinen materiaali ensin kirkastetaan ja sen jälkeen johdetaan kationinvaihtohartsikäsittelyyn. Parhaat tulokset saadaan heran käsittelyssä, jolloin edullisin kirkastusmenettely on mikrosuodatus.

Vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistettu proteiinipitoinen materiaali, edullisesti hera konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella riittävän proteiinipitoisuuden aikaansaamiseksi, minkä jälkeen näin saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja mahdollisesti kuivataan proteiinijauheeksi. Tällöin naudan insuliinista ainakin merkittävästi puhdistettu materiaali, kuten hera, jonka materiaalin pH on säädetty arvoon noin 6,5 elintarvikelaatuisella emäksellä, esimerkiksi NaOH:lla tai $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla, tai ioninvaihdolla, johdetaan ultra- ja diasuodatukseen, jolloin puoliläpäisevän kalvon avulla suurempimolekyyliset proteiinit saadaan eroon laktoosista, suoloista ja pienempimolekyylisistä proteiineista, kuten insuliinista, jonka molekyylipaino on noin 5734 D. Puoliläpäisevän kalvon cut off -arvo on sopivasti 6 000 - 20 000 D, edullisesti 10 000 D ja puoliläpäisevänä kalvona voidaan käyttää esimerkiksi polyeetterisulfonikalvoa, jonka cut off -arvo on 10 000 D.

Vaiheessa a) saatu hera voidaan konsentroida kokonaiskonsentrintisuhteella, joka sopivasti on noin 120. Tällöin vaiheessa a) käsitelty hera ultrasuodatetaan edullisesti 10 000 D cut off -kalvoilla ensin esimerkiksi konsentrintisuhteella 10, minkä jälkeen retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentrintisuhteeksi tulee 120. Näin saatu heraproteiinikonsentraatti, jonka proteiinipitoisuus on noin 90 % kuiva-aineesta, haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi esimerkiksi sumutuskuivauksella tai pakkas-kuivauksella.

Perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe, jonka proteiinipitoisuus on 70 - 80 %, sisältää 43 - 48 mikrogrammaa insuliinia / gramma jauhetta (noin 60 mikrogrammaa insuliinia / gramma proteiinia).

Sitä vastoin keksinnön mukaisen menetelmän vaiheiden a) ja b) mukaisesti saatu heraproteiinijauhe sisältää

merkittävästi vähemmin naudan insuliinia kuin edellä mainittu perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiini jauhe. Vahvalla kationinvaihtohartsilla vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistetusta herasta valmistetussa heraproteiini jauheessa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray -massaspektrometrillä. Näin saatu oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus sopii sellaisenaankin esimerkiksi äidinmaidonkorvikkeiden ja muiden erityisravintovalmisteiden raaka-aineeksi, koska sen sisältämä heraproteiini on ravitsemuksellisesti erittäin korkealaatuista eikä tarvitse muita proteiineja ravintosisäilyksen täydentämiseksi.

Kationinvaihtohartsikäsitteily voidaan tehdä myös esimerkiksi rasvattomalle maidolle tai vesiliuoksena olevalle maidon kaseiinille, joka on edullinen proteiinivalmiste. Naudaninsuliinijäämä voidaan poistaa kaseiiniliuoksesta vastaavalla tavalla kuin maidosta. Heraproteiinia heikomman ravintoarvonsa vuoksi kaseiini ei kuitenkaan ole yhtä suositeltavaa äidinmaidonkorvikkeen yksinomaiseksi proteiinilähteeksi kuin heraproteiini.

Mikäli keksinnön mukaisen proteiinikoostumuksen naudaninsuliinipitoisuutta halutaan vielä alentaa, voidaan sen valmistukseen liittää entsymaattinen hydrolyysi ja mahdollisesti vielä hydrofobinen kromatografiakäsittely. Tällöin vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiini jauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %. Liuoksen pH säädetään arvoon noin 8,5 esimerkiksi $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla ja lämpötila noin arvoon 50 °C, minkä jälkeen liuokseen lisätään eläin- tai mikrobiperäisiä entsyymejä, siten, että ne hydrolysoivat tehokkaasti erityisesti naudan insuliinin proteiiniketjun sidoksia. Tällaisia proteaaseja ovat mm. kymotrypsiini, subtilisiini Carlsberg -seriiniproteaasi, subtilisiini BPN' -seriiniproteaasi, Aspergillus oryzean seriini- ja metalloproteaasit, papaiini, Bacillus subtilis

-neutraaliproteaasi, termolysiini, Streptomyces griseuksen seriini- ja metalloproteaasit, pepsiini, Endothica parasitican hapaproteaasi ja pankreatiini. Hydrolyysin annetaan jatkua 8 tunnin ajan. Hydrolyysissä naudan insuliini pilkkoutuu korkeintaan viiden aminohapon pituisiksi peptideiksi, jotka eivät aiheuta immuunivastetta eivätkä sisällä aiemman insuliinimolekyylin sisältämiä epitoppeja. Näin saatu hydrolyysiseos johdetaan pilkkoutumattomien suurikokoisten molekyylien poistamiseksi ultrasuodatukseseen tiheään ultrasuodatuskalvon läpi, joka sopivasti on 2 000 D cut-off -kalvo. Saatu permeaatti kuivataan esimerkiksi sumutuskuivauksella jauheeksi. Saadussa tuotteessa ei ole todettavissa naudan insuliinia.

Jos naudan insuliinin hydrolyysituotteet halutaan poistaa seoksesta mahdollisimman tarkasti, voidaan edellä saatu heraproteiinihydrolysaatti johtaa sopivasti 10 % liuoksena hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn, joka poistaa hydrolysaatista hydrofobiset peptidit ja niiden mukana mahdolliset naudan insuliinin hydrolyysituotteet.

Kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä sopivasti hydrofobisella adsorptiohartsilla, kuten Amberlite XAD-16 -hartsilla (Rohm & Haas, Ranska), mutta se voidaan tehdä myös aktiivihiilellä, joka myös pystyy poistamaan hydrofobisia yhdisteitä. Tuotantomittakaavassa kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä käytännöllisesti pylväässä, jonne pakatun adsorptiohartsin tai aktiivihiilen läpi käsiteltävä liuos johdetaan. Pylvään läpi tullut liuos otetaan talteen, haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi. Näin saatu jauhe ei sisällä nyky menetelmillä havaittavia määriä naudan insuliinia. Tuotteen aminohappokoostumus on kuitenkin muuttunut jonkin verran hydrofobisten aminohappojen kohdalla, joten pieni määrä fenyylialaniinia ja tyrosiinia joudutaan lisäämään ravintovalmisteiden valmistuksen yhteydessä.

Edullisimmin naudan insuliini poistetaan lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, edullisesti herasta vahvalla kationinvaihtohartsilla, minkä jälkeen näin käsitelty nestemäinen proteiinipitoinen materiaali konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella. Mikrosuodatus esikäsitteilynä on edullista, koska insuliini on usein tarttuneena makromolekyyliin, kuten kaseiinipölyyn tai denaturoituneeseen heraproteiiniin, jotka voidaan poistaa sopivasti mikrosuodatuksen avulla. Mikäli em. menetelmillä ei ole saavutettu tuotteen riittävän alhaista naudaninsuliinipitoisuutta, sitä on mahdollista alentaa edelleen entsymaattisen hydrolyysin ja siihen mahdollisesti liitettävän hydrofobisen kromatografian avulla.

Äidinmaidonkorvikkeet koostetaan perinteisesti maidosta, kermasta, kasviöljystä, vähäsuolaisesta herajauheesta, kivennäisistä ja vitamiineista, joista maito, kerma ja vähäsuolainen herajauhe sisältävät naudan insuliinia. Heraproteiini on ravintoarvoltaan hyvin korkealuokkaista, joten se soveltuu ainoaksi proteiinilähteeksi äidinmaidonkorvikkeeseen ja muihinkin erityisravintovalmisteisiin.

Keksinnön mukaista oleellisesti insuliinitonta proteiinikoostumusta voidaan käyttää äidinmaidonkorvikkeen ja muidenkin erityisravintovalmisteiden proteiininiosana sekä esimerkiksi kulutusmaidon raaka-aineena. Tällöin saadaan valmiste, joka ei sisällä naudan insuliinia, joten se ei myöskään aiheuta immunisoitumista naudan insuliinille eikä siten lisää riskiä sairastua IDDM:ään.

Keksinnön kohteena on siten myös oleellisesti insuliiniton äidinmaidonkorvike samoin kuin oleellisesti insuliiniton erityisravintovalmiste, joille on tunnusomaista, että niiden oleellisesti insuliiniton proteiiniosa on valmistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvat-

tomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta, edullisesti kuitenkin herasta, sopivasti edellä kuvatulla tavalla.

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavissa esimerkeissä.

5

Esimerkki 1

6000 ml:n tuoretta juustoheraa pH laskettiin 10 % HCl:lla 5,4:ään. 300 ml vahvaa kationinvaihtohartsia (Amberlite C-20, Rohm & Haas, Ranska) pakattiin 300 ml:n laboratoriomitan pylvääseen ja regeneroitiin 600 ml:lla 17 % NaCl:a, jonka jälkeen pylväs huuhdottiin 1000 ml:lla vettä. Pylvään läpi ajettiin huoneenlämmössä 6000 ml juustoheraa (20 pylvääntilavuutta (BV)) nopeudella 6 BV/h. Ennen käsittelyä hera sisälsi 343 ng/ml insuliinia eli 68 mg insuliinia/kg todellista proteiinia, käsittelyn jälkeen herasta ei todettu lainkaan insuliinia eli pitoisuus aleni käsittelyssä 100 %. Heran kokonaisproteiinipitoisuus ei muuttunut merkittävästi käsittelyssä. Ennen käsittelyä proteiinipitoisuus oli 0,87 %, käsittelyn jälkeen 0,86 %. pH nostettiin 10 % NaOH:lla uudestaan 6,5:een, jonka jälkeen hera ultrasuodatettiin 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentroitisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentroitisuhteeksi tulee 120. Proteiinikonsentraatti pakkaskuivattiin 90 % proteiinia sisältäväksi jauheeksi.

25

Esimerkki 2

100 litraa 0,1 μ m mikrosuodatuskalvojen läpi suodatettua juustoheraa ultrasuodatetaan 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentroitisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentroitisuhteeksi tulee 120. Retentaatti sisälsi proteiinia 90 % kuiva-aineesta ja se sumutuskuiivattiin jauheeksi (kuivauslämmöt 180/75 °C). Käsittelemätön juustohera sisälsi insuliinia electro spray -massaspektrometrianalyysin mukaan 343 ng/ml

35

eli 68 mg/kg todellista proteiinia. Mikrosuodatettu hera sisälsi insuliinia 324 ng/ml eli 64 mg/kg todellista proteiinia. Ultra- ja diasuodatetussa heraproteiinikonsentraatissa insuliinipitoisuus oli 21 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan eli pitoisuus aleni proteiiniin suhteutettuna n. 69 %. Perinteinen 70 - 80 % proteiinia sisältävä ultrasuodatettu heraproteiinijauhe sisältää insuliinia n. 60 mg/kg todellista proteiinia.

Esimerkki 3

10 100 litraa happokaseiinin valmistuksesta saatua happoheraa mikrosuodatettiin vastaavasti 0,1 μ m:n kalvojen läpi. Heran pH oli 4,5. Mikrosuodatettu hera ultra- ja diasuodatettiin vastaavasti kuin esimerkissä 1 siten, että kokonaiskonsentrintisuhteeksi tuli 120. Proteiinipitoisuus oli tällöin noin 90 % kuiva-aineesta. Käsittelemätön hera sisälsi insuliinia 320 ng/ml eli 48 mg/kg todellista proteiinia, mikrosuodatettu 295 ng/ml eli 45 mg/kg todellista proteiinia ja ultra- ja diasuodatetussa heraproteiinikonsentraatissa insuliinia oli 95 ng/ml eli 16 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan määritettynä. Siten insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 67 %.

Esimerkki 4

25 60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 5,040 kg esimerkissä 1 valmistettua heraproteiinijauhetta, 11,423 kg kasvirasvaseosta, 11,232 kg glukosia, 12,260 kg maltodekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesi-seosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiinihapon, koliinin, inositolin, ferroglukonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin, kupariglukonaatin) sekä 70 g kalsiumkloridia, 300 g kalsiumfosfaattia, 65 g magnesiumsulfaattia, 125 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumu-

tuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen äidinmaidonkorvikkejauheen kaltaista.

5 Esimerkki 5

Esimerkissä 1 esitetty heraproteiinikonsentraatti laimennettiin 5 % pitoisuuteen vedellä. Liuos pastöroitiin 65 °C:ssa 20 min ajan ja jäähdytettiin 50 °C:een. pH säädettiin 8,5:een 10 % Ca(OH)₂:lla. Seokseen lisättiin 6 %
10 proteiinin määrästä pankreatiini (4 x USP, SPL, USA) - ja Alcalase 0,6 L -entsyymejä (Novo Industri A/S; Tanska). Hydrolyysin aikana seoksen pH:ta pidettiin 7,0:ssa Ca(OH)₂-lisäysten avulla. Seoksen annettiin hydrolysoitua 8 tunnin ajan, jonka jälkeen seos lämpökäsiteltiin 5 min
15 90 °C:ssa. Tämän jälkeen seos jäähdytettiin 50 °C:een ja ultrasuodatettiin 2000 D cut-off -kalvoilla ja permeaatti kerättiin talteen. Saatu permeaatti sumutuskuiivattiin jauheeksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia.

Esimerkki 6

20 Esimerkissä 5 saatu hydrolysaatti liuotettiin 10 % liuokseksi. 30 ml Amberlite XAD-16 -hartsia (Rohm & Haas) pakattiin laboratoriomittakaavaiseen pylvääseen, joka regeneroitiin 60 ml:lla 4 % NaOH, huuhdeltiin 1000 ml:lla vettä ja regeneroitiin 60 ml:lla 4 % HCl:a ja huuhdeltiin
25 vedellä kunnes läpitulleen veden pH oli yli 5. Hydrolysaattiliuosta ajettiin 1700 ml hartsipylvään läpi, mikä vastasi 567 g hydrolysaattikuiva-ainetta/100 ml hartsia. Läpitulnut liuos otettiin talteen ja pakkaskuiivattiin jauheeksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia.
30 Hydrolysaatti käytettiin maitoallergikoille tarkoitetun erityisravintovalmisteen yksinomaisena proteiinilähteenä.

Esimerkki 7

60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 8,670 kg
esimerkin 6 mukaisesti valmistettua heraproteiinihydrolysaattijauhetta, 10,466 kg kasvirasvaseosta, 16,058 kg
35

glukoosia, 5,233 kg maltodekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesiseosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiinihapon, koliinin, inositolin, ferroglukonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin, kupariglukonaatin) sekä 10 g kalsiumkloridia, 320 g kalsiumfosfaattia, 70 g magnesiumsulfaattia, 165 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia, 1 g L-tyrosiinia ja 2 g L-fenyylialaniinia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumutuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen esim. maitoallergikoille tarkoitettun erityisravintovalmisteen kaltaista.

Esimerkki 8

Vahva kationinvaihtopylväs (30 ml hartsia) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. 600 ml:n rasvatonta maitoa pH säädettiin 5,4:ään. pH-säädetty maito ajettiin huoneenlämmössä pylvään läpi kuten esimerkissä 1, jolloin maidosta poistui osa kalsiumista, mutta myös huomattava osa insuliinista. RIA-analyysin mukaan (massaspekrometri ei ollut käytettävissä maidolle) käsittelemätön maito sisälsiaudan insuliinia 26 μ IU/ml ja käsitelty 17 μ IU/ml. Insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 35 %. Käsittely ei ollut riittävä insuliinin täydelliseen poistamiseen maidosta, mutta esimerkki kuvaa, että menetelmä sopii myös muiden maitoraaka-aineiden kuin heran käsittelyyn.

Esimerkki 9

Kationinvaihtoharts (30 ml) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. Natriumkaseinaatista valmistettiin 3 % liuos veteen. pH laskettiin 5,5:een laimealla HCl:llä. Kaseinaattiliuos pumpattiin kationinvaihtohartsin läpi huoneenlämmössä kuten maito esimerkissä 8. Ennen käsittelyä

kaseinaattiliuos sisälsi insuliinia RIA-analyysin mukaan 26 μ IU/ml ja käsitelty liuos 10 μ IU/ml. Insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 62 %.

Patenttivaatimukset

1. Oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, joka on käyttökelpoinen erityisravintovalmisteiden protei-
5 teiniosana tai kulutusmaidon raaka-aineena, t u n -
n e t t u siitä, että se on lehmänmaidosta peräisin oleva
rasvaton, oleellisesti naudan insuliiniton proteiinipitoinen
materiaali, kuten hera, rasvaton maito tai kaseiinili-
uos.

10 2. Menetelmä oleellisesti insuliinittoman protei-
ninkoostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u sii-
tä, että

a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasva-
ton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpois-
15 tokäsittelyyn, jolloin se mahdollisesti ensin kirkastetaan
ja sen jälkeen se johdetaan ph-arvon ollessa 5,2 - 5,6,
Na⁺- tai K⁺-muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihto-
hartsilla täytetyn pylvään läpi,

b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen
20 materiaali

konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen
kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja,

saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja
mahdollisesti kuivataan proteiinijauheeksi,

25 c) mahdollisesti

1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista
tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka
proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoi-
30 daan entsymaattisesti proteaaseilla ja

3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ult-
rasuodatetaan, ja

d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu pro-
teiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn
35 ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi.

5 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäisenä rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina käytetään heraa, rasvatonta maitoa tai kaseiiniliuosta, edullisesti heraa.

10 4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä suodattamalla se mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

15 5. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä käsittelemällä sitä ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat 50 000 - 200 000 D cut-off -kalvoja.

20 6. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä sentrifugoimalla se edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

25 7. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatuksessa käytetään kalvoja, jotka ovat 10 000 D cut-off -kalvoja.

30 8. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatetusta proteiinikonsentraatista muodostetaan vesiliuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %, ja joka hydrolysoidaan entsyymaattisesti proteaaseilla, kuten pankreatiini- ja alkalaasientsyymeillä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan hydrofobiseen kromatografia-
käsittelyyn, jolloin sitä käsitellään aktiivihiilellä tai
5 edullisesti hydrofobisella polystyreenipohjaisella adsorp-
tiohartsilla.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen tai jonkin pa-
tenttivaatimuksista 2 - 9 mukaisella menetelmällä valmis-
tetun proteiinikoostumuksen käyttö äidinmaidonkorvikkeen
10 tai jonkin muun erityisravintovalmisteen proteiiniosana
tai kulutusmaidon raaka-aineena.

11. Oleellisesti insuliiniton äidinmaidonkorvike, t u n n e t t u siitä, että sen proteiiniosa on oleelli-
sesti naudaninsuliiniton, lehmänmaidosta peräisin oleva
15 rasvaton proteiinipitoinen materiaali, kuten hera, rasva-
ton maito tai kaseiiniliuos, edullisesti hera.

12. Oleellisesti insuliiniton erityisravintovalmis- te, t u n n e t t u siitä, että sen proteiiniosa on
oleellisesti naudaninsuliiniton, lehmänmaidosta peräisin
20 oleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali, kuten hera,
rasvaton maito tai kaseiiniliuos, edullisesti hera.

13. Menetelmä oleellisesti insuliinittoman äidin-
maidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen
tai kulutusmaidon tai sen raaka-aineen valmistamiseksi,
25 t u n n e t t u siitä, että tuotteen valmistuksessa pro-
teiiniosana käytetään patenttivaatimuksen 1 mukaista tai
jonkin patenttivaatimuksista 2 - 9 mukaisesti valmistettua
proteiinikoostumusta.

Kuva 1:

IgG-luokan vasta-ainetaso naudan insuliinia kohtaan 6 kuukauden ikäisillä lapsilla, jotka ovat saaneet pelkästään rintamaitoa tai lisäruokintana tavallista äidinmaitokorviketta (Enfamil®)

